

Identifikasi Molekuler dan Analisis Kekerabatan Akses Nenas Menggunakan Marka RAPD Menunjang Perakitan Varietas Unggul Baru (*Molecular Identification and Relationships Among Several Pineapple Accessions Using RAPD Marker to Support the Assembling New Varieties*)

Sri Hadiati, Riry Prihatini dan Ellina Mansyah

Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika, Jln. Raya Solok-Aripan Km 8, Solok, Sumatera Barat, Indonesia 27301
E-mail: shadiati@yahoo.com

Diterima: 4 April 2018; direvisi: 10 Juli 2018; disetujui: 20 Juli 2018

ABSTRAK. Produksi dan produktivitas nenas dapat ditingkatkan antara lain melalui penggunaan varietas unggul. Dalam perakitan varietas, dibutuhkan informasi hubungan kekerabatan antartetunya agar diperoleh efek heterosis yang tinggi melalui kegiatan identifikasi secara molekuler. Penelitian bertujuan (1) mengetahui tingkat polimorfisme primer yang digunakan, (2) mengidentifikasi fragmen DNA spesifik yang membedakan individu atau kelompok individu nenas, dan (3) mengetahui hubungan kekerabatan antarspesies dan akses nenas. Penelitian dilaksanakan mulai bulan Mei–Desember 2014 di Laboratorium Uji Mutu Benih dan Molekuler Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika. Sampel yang digunakan sebanyak 19 akses dari empat spesies nenas (*Ananas comosus*, *A. bracteatus*, *A. lucidus*, dan *A. nanus*). Sebanyak 20 marka *rapid amplified polymorphism DNA* (RAPD) digunakan dalam analisis. Data diskor secara biner kemudian dianalisis menggunakan program NTSYSpc 2.1x. Hasil analisis menunjukkan bahwa polimorfisme 20 primer yang diuji berkisar 33–100% dengan rata-rata 87%. Primer dengan tingkat polimorfisme 100%, yaitu RAPD3, OPA13, OPAV3, OPC12, OPC16, dan OPY15. Kelompok Cayenne dicirikan oleh marka RAPD1 ukuran 1.000 *base-pair* (bp) dan OPAV3 700 bp. Kelompok Queen dapat diidentifikasi oleh marka RAPD3 ukuran 700 bp, kelompok Spanish dengan marka RAPD2 dan RAPD3 ukuran 1.500 bp. Analisis kluster menunjukkan bahwa 19 akses yang diuji terpisah menjadi enam kelompok pada koefisien kesamaan genetik 0,75, yaitu kelompok Queen, Cayenne, Spanish, *A. bracteatus*, *A. lucidus*, dan *A. nanus*. Akses yang diuji mempunyai keragaman genetik yang luas dengan koefisien kesamaan genetik berkisar 0,41–0,85. Akses yang mempunyai kesamaan genetik tertinggi, yaitu antara N-73 dengan BB (0,85) dan terkecil, yaitu antara N-94 (*A. nanus*) dengan N-18 (Green Spanish) sebesar 0,41. Implikasi hasil penelitian adalah akses yang mempunyai kesamaan genetik tinggi salah satunya dapat dieliminasi untuk efisiensi dalam pengelolaan plasma nutfah, sedangkan akses-akses yang memiliki kesamaan genetik kecil, baik digunakan sebagai tetua persilangan agar diperoleh variabilitas genetik yang luas dan efek heterosis yang tinggi.

Kata kunci: *Ananas* spp.; Identifikasi; Karakterisasi; Kekerabatan genetik; Molekuler

ABSTRACT. Pineapple production and productivity can be increased by the use of superior variety. Pertaining to variety assembling, the relationship information among parents is needed to gain heterosis effect through molecular identification activity. This research was aimed to (1) determine the level of polymorphism primers used, (2) identify specific DNA fragments which discrete individual or group of pineapple, and (3) reveal genetic relationship among pineapple species and accessions. The experiment was conducted on May to December 2014 in Seeds Quality Testing and Molecular Laboratory of Indonesian Tropical Fruit Research Institute. Nineteen accessions from four species (*Ananas comosus*, *A. bracteatus*, *A. lucidus*, and *A. nanus*) of pineapple were used as samples. Twenty *rapid amplified polymorphism DNA* (RAPD) markers were used on molecular analysis. The data were scored binary and then they were analyzed using NTSYSpc 2.1x computer software. The analysis showed that the 20 primers had 33–100% polymorphic with 87% in average. Primers with 100% polymorphism level were RAPD3, OPA13, OPAV3, OPC12, OPC16, and OPY15. Cayenne group could be denoted with RAPD1 and OPAV3 markers by 1,000 base-pairs (bp) and 700 bp band, respectively. Meanwhile the Queen group can be identified by 700 bp band RAPD3 marker. The Spanish group can be specified by 1,500 bp band RAPD2 and RAPD3 markers. Based on cluster analysis the 19 accessions were separated into six groups with 0.75 genetic similarity coefficient i.e., Queen, Cayenne, Spanish, *A. bracteatus*, *A. lucidus*, and *A. nanus*. These accessions had a wide genetic diversity with 0.41 to (0.85) genetic similarity coefficients. The highest genetic similarity coefficient (0.85) was determined between N-73 and BB, whereas the lowest value down to 0.41 was indicated on N-94 (*A. nanus*) and N-18 (Green Spanish). The implications of this research are that one of two accessions that have high genetic similarities can be eliminated for efficiency in the management of germplasm. While accessions which have little genetic similarity are both used as crosses parent in order to obtain wide genetic variability and high heterosis effects.

Keywords: *Ananas* spp.; Identification; Characterization; Genetic relationship; Molecular

Nenas (*Ananas comosus* L.) merupakan salah satu buah unggulan di Indonesia. Hal ini mengacu pada besarnya produksi nenas yang menempati urutan ketiga

setelah pisang dan mangga, produksinya mencapai 1.729.600 ton dengan produktivitas 117,71 ton/ha pada tahun 2015 (Pusdatin 2016). Produksi dan produktivitas

nenas tersebut dapat ditingkatkan antara lain melalui penggunaan varietas unggul. Varietas unggul dapat diperoleh dengan cara seleksi terhadap klon-klon yang berkembang di masyarakat/klon lokal, introduksi, maupun perakitan varietas (Borojević 1990). Perakitan varietas nenas diarahkan untuk mendapatkan varietas yang berdaya hasil tinggi dan kualitas baik, daun tidak berduri, tangkai buah pendek dan kuat, bentuk buah silindris, bentuk mata lebar dan dangkal, daging buah berwarna lebih kuning, memenuhi standar untuk konsumsi segar dan olahan serta tahan hama penyakit (Py, Lacoëuilhe & Teisson 1987). Perakitan varietas membutuhkan variabilitas fenotipik dan genotipik yang luas. Informasi tersebut dapat diperoleh antara lain melalui kegiatan karakterisasi atau identifikasi.

Karakterisasi/identifikasi merupakan kegiatan mendeskripsikan semua informasi yang dimiliki oleh setiap individu (Rugayah 2006). Hasil identifikasi tersebut juga dapat digunakan untuk mengetahui jarak genetik dan hubungan kekerabatan melalui analisis kluster (Hadiati, Yulianti & Sukartini 2009). Dalam persilangan, semakin jauh jarak genetik antartetua yang digunakan maka berpeluang memperoleh hibrida dengan tingkat heterosis yang tinggi (Tatineni, Cantrell & Davis 1996). Sebaliknya, pada tanaman menyerbuk silang, persilangan antarindividu berkerabat dekat cenderung menghasilkan keturunan yang lemah, ukuran buah kecil, kurang subur, dan banyaknya individu yang cacat (Sriyadi *et al.* 2002). Identifikasi dapat dilakukan melalui penanda morfologi, agronomi, dan molekuler. Kelemahan karakterisasi secara morfologi antara lain adanya pengaruh lingkungan, umur tanaman, bagian tanaman, dan fase pertumbuhan tanaman (Carvalho *et al.* 2004; Nandariyah, Soemartono & Taryono 2004; Ines *et al.* 2009). Oleh karena itu perlu dilakukan identifikasi secara molekuler.

Salah satu indentifikasi secara molekuler, yaitu dengan *random amplified polymorphic DNA* (RAPD). Metode RAPD ini mempunyai banyak kelebihan dibandingkan penanda DNA lainnya, yaitu tidak memerlukan pengetahuan mengenai urutan oligonukleotida sampel, hanya membutuhkan DNA sedikit (0,5 ng), jumlah karakter yang dapat diamati tidak terbatas, teknik pengerjaan dan analisis sederhana dan cepat (Williams *et al.* 1990; Popluechai, Onto & Eungwanichayapant 2007; Roostika, Khumaida, & Ardie 2015). RAPD telah banyak digunakan pada bidang pemuliaan tanaman, antara lain untuk mengetahui keragaman genetik dalam spesies *A. comosus* (Ruas *et al.* 1995; Meinarti 2011), hubungan kekerabatan pada genus *Ananas* dan *Pseudananas* (Ruas, Ruas & Cabral 2001; Sripaoraya *et al.* 2001), *mapping* genetik pada *A. bracteatus* dan *A. comosus* menggunakan strategi *pseudo-testcross*

(Carlier *et al.* 2004) maupun mendeteksi variasi somaklonal eksplan nenas (Santos, Buso & Torres 2008; Roostika, Khumaida & Ardie 2015). Selain itu, RAPD juga bermanfaat untuk melindungi sumber daya genetik tanaman melalui penyediaan data sidik jari DNA. Beberapa jenis primer telah digunakan untuk identifikasi tanaman buah tropika, primer RAPD1, RAPD2, RAPD3, RAPD4, RAPD5, dan RAPD6 telah digunakan untuk identifikasi tanaman manggis (Mansyah 2012) dan jambu air (Hadiati *et al.* 2015), sedangkan primer OPA, OPC, OPS OPY, dan OPAK telah digunakan untuk identifikasi dan mengetahui kekerabatan nenas (Williams *et al.* 1990; Sripaoraya *et al.* 2001; Popluechai, Onto & Eungwanichayapant 2007; Ines *et al.* 2009).

Tujuan penelitian, yaitu (1) mengetahui tingkat polimorfisme primer yang digunakan, (2) mengidentifikasi fragmen DNA spesifik yang membedakan individu atau kelompok individu sampel tanaman nenas yang digunakan, dan (3) mengetahui kekerabatan antarspesies dan aksesori nenas. Hipotesis penelitian ini adalah terdapat fragment DNA spesifik sebagai pembeda individu atau kelompok individu dan aksesori yang diuji mempunyai keragaman genetik yang luas.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Mei - Desember 2014 di Laboratorium Uji Mutu Benih dan Molekuler Balai Penelitian Tanaman Buah (Balitbu) Tropika, Solok.

Bahan yang digunakan adalah 19 aksesori nenas koleksi plasma nutfah Balitbu Tropika yang mewakili empat spesies, yaitu *A. comosus* (Queen, Cayenne, Spesies), *A. bracteatus*, *A. lucidus*, dan *A. nanus* yang ditanam di Kebun Percobaan Aripin-Solok dengan umur kurang dari 1 tahun. Sampel dari kelompok Queen diwakili oleh aksesori N-05, N-35, Cayenne oleh N-68, N-72, dan N-73, Green Spanish oleh N-18, Red Spanish oleh N-19, *A. bracteatus* oleh N-62, dan N-85, *A. lucidus* oleh N-61, dan *A. nanus* oleh N-94, aksesori hasil perbanyakan kultur jaringan nenas dari kelompok Queen (Y, G3, dan G13) dan kelompok Cayenne (BB dan D). Selain itu juga dianalisis tiga aksesori yang belum diketahui pengelompokannya, yaitu N-25, N-32, dan N-30. Pemeliharaan tanaman dilakukan sesuai dengan SOP nenas. Daftar plasma nutfah nenas yang digunakan dan ciri morfologi utamanya disajikan pada Lampiran 1.

Analisis Molekuler

- a. Ekstraksi, purifikasi, dan penentuan kuantitas DNA
Sebanyak 0,1 g sampel daun muda nenas yang segar (Lampiran 1) diekstraksi menggunakan metode (Doyle & Doyle 1987) dengan modifikasi melalui penambahan 1% PVP (*polyvinyl polypyrrolidone*). Perkiraan kuantitas DNA ditentukan dengan metode elektroforesis pada gel agarose 1,2%. Sebanyak 5 µl DNA hasil ekstraksi ditambah dengan 1 µl *loading dye* dimasukkan pada sumur gel dan dielektroforesis selama 45 menit. Hasil elektroforesis diberi pewarnaan *ethidium bromida* 1%. Kuantitas DNA ditentukan dengan membandingkan ketebalan pita DNA dengan *lambda* DNA melalui visualisasi pada UV transiluminator dan dipotret dengan gel doc Biometra. DNA yang diperoleh diencerkan sampai volume 20 ng dan siap diamplifikasi.

- b. Amplifikasi DNA

Sebanyak 30 primer RAPD diuji pada dua sampel nenas. Primer yang menunjukkan pita yang jelas dan polimorfisme digunakan lebih lanjut dalam penelitian. Primer hasil seleksi tersebut, yaitu RAPD1, RAPD2, RAPD3, RAPD4, RAPD5, RAPD6, OPA3, OPA13, OPAV3, OPAV6, OPC8, OPC9, OPC12, OPC14, OPC16, OPC19, OPC20, OPS12, OPY15, dan OPAK19. Total volume reaksi amplifikasi adalah 25 µl yang terdiri atas 2 µl (20 ng) *template* DNA, 12,5 µl Go Taq Green Master Mix (Promega M7122), 1 µl primer (20 µM), dan 9,5 µl air bebas ion. Amplifikasi dilakukan menggunakan PCR *Thermocycler*, *Eppendorf* diprogram sebagai berikut: predenaturasi pada suhu 94°C selama 10 menit, dan 30 siklus yang terdiri atas denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu sesuai primer yang digunakan selama 0,5 menit, ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit setelah itu ditambahkan pula satu siklus ekstensi final pada suhu 72°C selama 7 menit. Produk amplifikasi kemudian dielektroforesis dengan agarose gel 1,2% pada larutan TAE *buffer* 1X.

Analisis Data

Data genotipik dari aksesori tanaman nenas yang diperoleh dari pemotretan gel hasil elektroforesis diskor berdasarkan ada dan tidaknya pita. Jika ada pita diberi skor 1 dan jika tidak diberi skor 0. Selanjutnya data skoring digunakan untuk menganalisis:

1. Tingkat polimorfisme primer yang digunakan, dihitung dengan rumus:

$$\frac{\Sigma \text{ pita DNA polimorfik}}{\Sigma \text{ total pita DNA yang dihasilkan}} \times 100\%$$

2. Identifikasi fragmen DNA spesifik yang membedakan individu atau kelompok individu sampel yang digunakan dengan cara mengidentifikasi perbedaan pola pita DNA antarsampel yang ditunjukkan oleh jumlah pita dan jarak migrasinya. Pita DNA yang dimiliki bersama oleh individu atau spesies dapat diduga sebagai penciri kelompok tersebut.
3. Analisis kekerabatan antarspesies dan aksesori nenas dianalisis menggunakan program *numerical taxonomy and multivariate analysis (NTSYSpc)* versi 2,1x dengan metode *unweight pair-group methode arithmetic* (UPGMA) (fungsi *similarity kualitatif*) (Rohlf 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tingkat Polimorfisme Marka RAPD

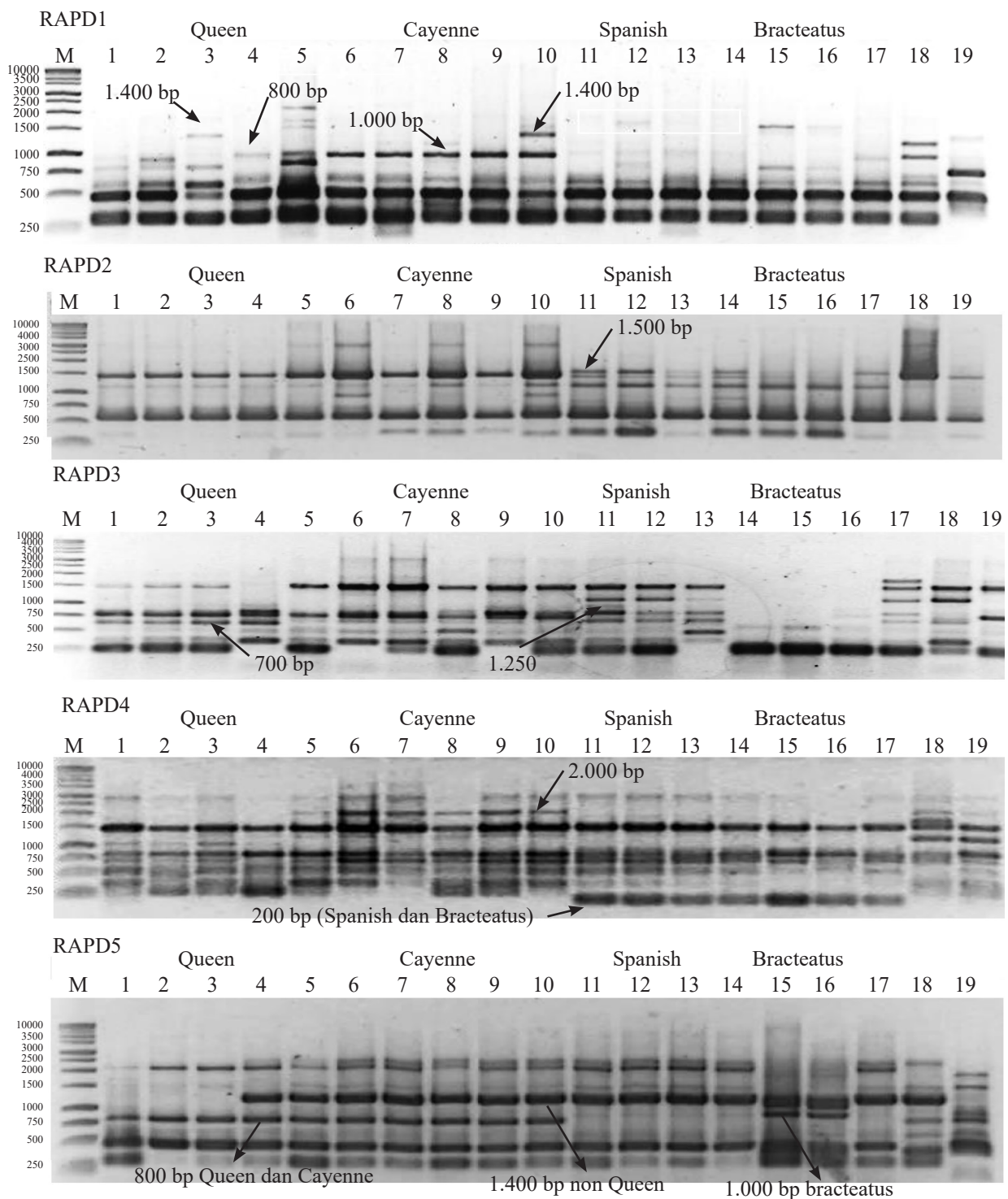
Tingkat polimorfisme dari 20 primer RAPD pada 19 aksesori nenas yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1. Sejumlah 173 pita DNA telah dihasilkan dengan jumlah maksimum 13 pita pada RAPD4 dan minimum tiga pita pada OPC19. Produk amplifikasi tersebut terdiri atas 150 pita polimorfik, 23 pita monomorfik dengan ukuran pita antara 250 bp sampai 2.000 bp. Tingkat polimorfisme 20 primer yang diuji berkisar antara 33% (rendah) sampai 100% (sangat tinggi) dengan rata-rata 87%. Primer dengan tingkat polimorfisme 100% dihasilkan oleh primer RAPD3, OPA13, OPAV3, OPC12, OPC16, dan OPY15. Primer-primer tersebut mempunyai kemampuan yang lebih tinggi dalam mendeteksi keragaman genetik nenas dibandingkan primer lainnya. Hasil penelitian Roostika, Khumaida & Ardie (2015) menunjukkan bahwa OPA13 juga mempunyai tingkat polimorfisme 100% pada identifikasi variasi somaklonal nenas hasil kultur jaringan.

Identifikasi Fragmen DNA Spesifik yang Membedakan Individu dan Spesies Nenas

Bagian dari profil pita DNA 19 aksesori nenas disajikan pada Gambar 1 dan 2. Berdasarkan produk PCR tersebut dijumpai beberapa pita yang khas atau unik yang dimiliki individu, kelompok atau spesies yang digunakan. Marka spesifik RAPD1 ukuran 1.000 bp merupakan marka spesifik untuk kelompok Cayenne. Marka spesifik RAPD2 1.500 bp dan RAPD3 1.250 bp hanya dimiliki oleh individu pada kelompok Spanish, sedangkan RAPD3 700 bp hanya dimiliki oleh individu pada kelompok Queen. Marka spesifik RAPD4 2.000 bp hanya dimiliki oleh kelompok Cayenne. Marka spesifik RAPD5 1.000 bp, OPA3 1.250 bp, dan OPC20 1.500 bp dimiliki oleh kelompok Bracteatus.

Tabel 1. Tingkat polimorfisme 20 primer berdasarkan pola pita DNA pada nenas (*Polymorphism levels of 20 primers based on the pineapple DNA banding patterns*)

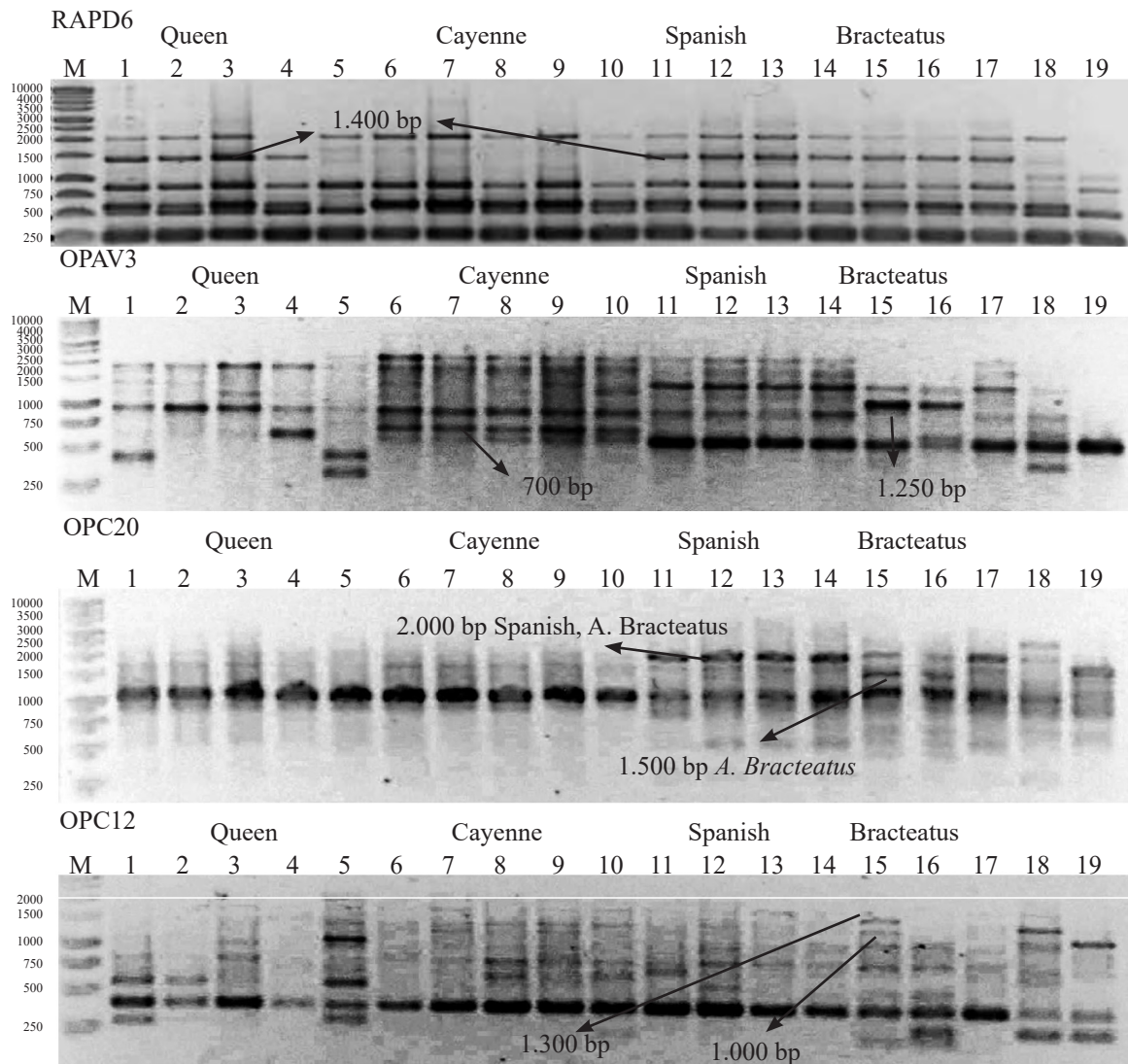
Primer dan sekuen (Primer and sequences) 5' - 3'	Total pita teramplifikasi (Total bands)	Jumlah pita polimorfik (Number of polymorphic bands)	Jumlah pita monomorfik (Number of monomorphic bands)	Tingkat polimorfisme (Polymorphysm level), %
RAPD1 (GCGGGTGGAA)	12	11	1	92
RAPD2 (GTT TCGCTCC)	7	6	1	86
RAPD3 (GTAGACCCGT)	10	10	0	100
RAPD4 (AAGAGCCCGT)	13	9	2	69
RAPD5 (AACGCGCAAC)	11	9	2	82
RAPD6 (CCCGTCAGCA)	11	8	3	73
OPA3 (AGT CAGCCAC)	4	2	2	50
OPA13 (CAGCACCCAC)	7	7	0	100
OPAV3 (TGTAGCCGTG)	10	10	0	100
OPAV6 (CCCGAG ATCC)	8	7	1	88
OPC8 (TGGACCGGTG)	10	8	2	80
OPC9 (CTCACCGTCC)	3	1	2	33
OPC12 (TGTCATCCCC)	8	8	0	100
OPC14 (TGTCATCCCC)	9	8	1	89
OPC16 (CACACT CCAG)	10	10	9	100
OPC19 (TTCCCCCAG)	3	2	1	97
OPC20 (ACTTCGCCAC)	7	6	1	86
OPS12 (CTGGGTGAGT)	11	10	1	91
OPY15 (AGTCGCCCTT)	9	9	9	100
OPAK19 (TCGCAGCGAG)	10	9	1	90
Total	173	150	23	87



Gambar 1. Profil pola pita DNA 19 akses dari empat spesies nenas menggunakan primer RAPD1, RAPD2, RAPD3, RAPD4, dan RAPD5 (*Profile of DNA banding patterns of 19 accessions from four species of pineapple using RAPD1, RAPD2, RAPD3, RAPD4, and RAPD5 primers*)

Selain membedakan antarkelompok, pita spesifik juga dapat membedakan individu dalam kelompok. Akses no. 3 memiliki marka spesifik RAPD1 1.400 bp yang tidak dimiliki oleh individu dalam kelompok Queen. Akses no. 10 memiliki marka spesifik RAPD1 1.400 bp yang tidak dimiliki oleh individu lainnya dalam kelompok Cayenne. Akses no. 3 berasal dari kultur jaringan yang sumber eksplannya berasal dari

aksesi no.2 dan akses no.10 berasal dari sumber eksplan no.8 (Lampiran 1). Hal ini menunjukkan bahwa akses no. 3 dan no. 10 kemungkinan genetiknya telah mengalami perubahan dari sumber eksplannya. Variasi genetik pada tanaman nenas yang berasal dari kultur jaringan juga ditemukan pada *A. comosus* var. Queen (Soneji, Rao & Mhatre 2002), *A. comosus* var. Amarelinho (Feuser et al. 2003), dan *A. bracteatus*

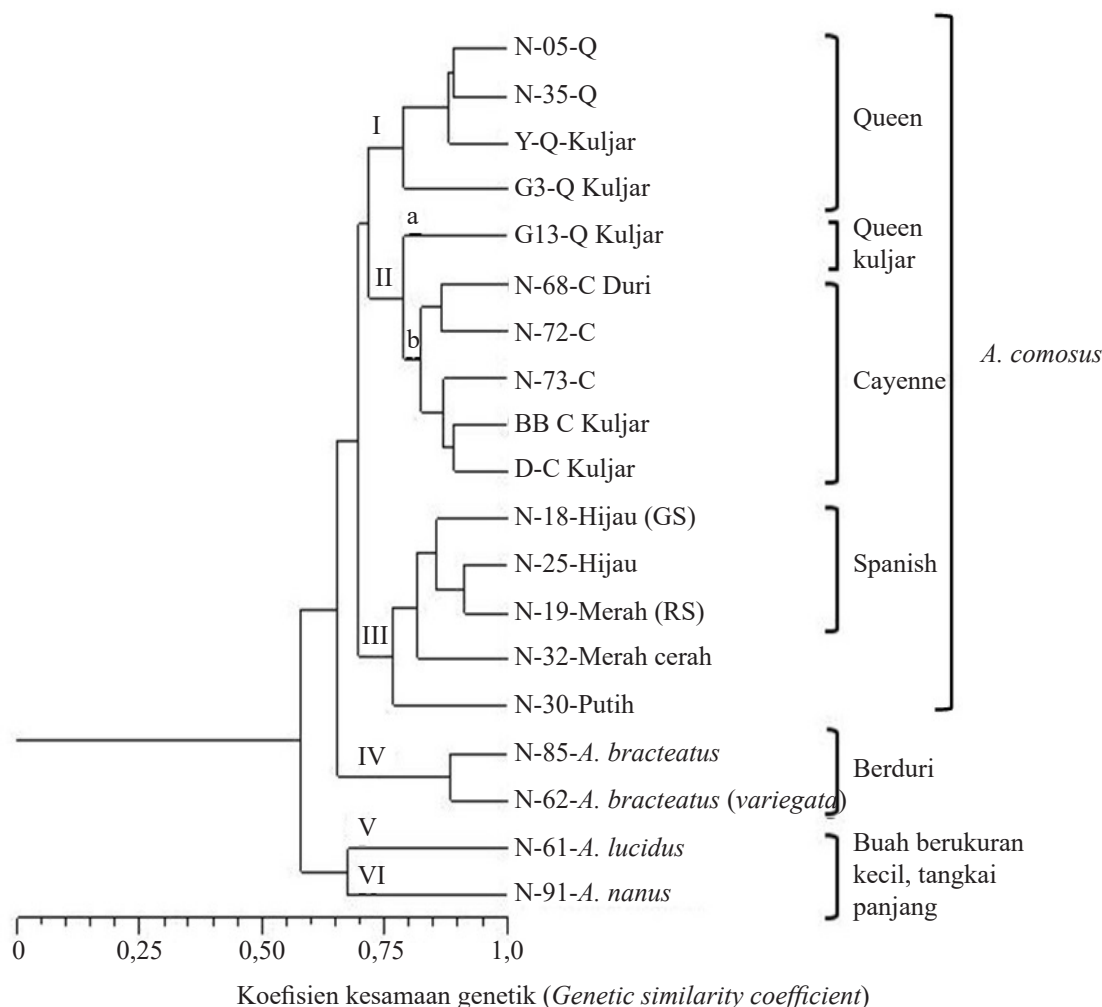


Gambar 2. Profil pola pita DNA 19 aksesori dari empat spesies nenas menggunakan primer RAPD6, OPAV3, OPC20, dan OPS12 (*Profile of DNA banding patterns of 19 accessions from four species of pineapple using RAPD6, OPAV3, OPC20, and OPS12 primers*)

Tabel 2. Fragmen DNA yang dapat membedakan individu/kelompok individu nenas (*Fragmen of DNA which can distinguish individual/group of pineapple*)

Spesies/kelompok aksesori (<i>Spesies/accession group</i>)	Fragmen DNA spesifik (<i>Specific DNA fragmen</i>)
Cayenne	RAPD1-1.000 bp; RAPD4 2000 bp; OPAV3-700 bp
Queen	RAPD3-700 bp
Spanish	RAPD2-1.500 bp; RAPD3-1500 bp
Non Cayenne	RAPD6- 1.400 bp
Non Queen	RAPD5-1.400 bp
Queen dan Cayenne	RAPD5-800 bp
Spanish , <i>A. bracteatus</i>	RAPD4-200 bp ; OPC20-1.500 bp
<i>A. bracteatus</i>	RAPD5-1.000 bp; OPAV3-250 bp; OPC20-1.000 bp
<i>A.bracteatus variegata</i>	OPS12-1.300 bp (-); OPS12-1.000 bp (-)
Cayenne kuljar (<i>Tissue culture</i>)	RAPD1-1.400 bp (+)
Queen kuljar (<i>Tissue culture</i>)	RAPD1-1.400 bp (+)

Keterangan (*Remarks*): (-): Terjadi pengurangan pita dari kelompok (*Occuring band reduction from its group*)
 (+): Terjadi penambahan pita dari kelompok (*Occuring band increment from its group*)



Gambar 3. Dendrogram 19 aksesori nenas berdasarkan analisis kluster UPGMA menggunakan 20 primer (Dendrogram of 19 pineapple accessions based on UPGMA cluster analysis using 20 primers)

(Santos, Buso & Torres 2008). Terjadinya *off types* dapat disebabkan oleh berbagai faktor, antara lain periode *in vitro* yang panjang (Masoud & Hamta 2008; Roostika, Khumaida & Ardie 2015), zat pengatur tumbuh (Bairu, Fennell & van Staden 2009), dan frekuensi subkultur yang tinggi (Eeuwens *et al.* 2002).

Berdasarkan hasil analisis tersebut diketahui bahwa marka RAPD dapat digunakan untuk identifikasi genetik antaraksesi dan antarspesies nenas serta untuk mendeteksi perubahan genetik aksesori nenas hasil perbanyakan secara kultur jaringan. Pita-pita spesifik yang dihasilkan tersebut dapat dianalisis lebih lanjut melalui analisis sekuensing untuk mengetahui urutan DNA-nya dan menduga sifat yang dibawa oleh masing-masing marka tersebut. Daftar fragmen DNA spesifik untuk masing-masing kelompok disajikan pada Gambar 1, 2, dan Tabel 2.

Analisis Kekerabatan Antaraksesi/Spesies Nenas

Berdasarkan pola pita 20 primer RAPD tersebut, kemudian ditentukan nilai matriks kesamaan genetik.

Nilai koefisien kesamaan genetik 19 aksesori nenas berkisar antara 0,41–0,85 dan keragaman genetik tersebut tergolong luas (Lampiran 2). Antara aksesori N-73 (Cayenne) dengan BB (Cayenne kultur jaringan) mempunyai koefisien kesamaan genetik terbesar (0,85), sedangkan antara N-94 (*A. nanus*) dengan N-18 (Green Spanish) mempunyai koefisien kesamaan genetik terkecil (0,41). Keragaman genetik nenas yang luas tersebut disebabkan oleh tanaman nenas tergolong tanaman menyerbuk silang. Sifat *self-incompatible* pada *A. comosus* memungkinkan tidak diperolehnya galur *inbred* (Brewbaker & Gorrez 1967). Selain itu, walaupun tanaman nenas diperbanyak secara vegetatif, tetapi karakternya tidak selamanya dapat dipertahankan keseragamannya karena tingginya tingkat mutasi somatik atau dipengaruhi oleh lingkungan yang ekstrim (Collins 1968; Kato *et al.* 2005). Aksesori-aksesori yang mempunyai kesamaan genetik besar tersebut salah satunya dapat dieliminasi untuk efisiensi pengelolaan plasma nutfah nenas, seperti yang dilakukan oleh Ines *et al.* (2009),

sedangkan aksesi-aksesi yang memiliki kesamaan genetik kecil, baik digunakan sebagai tetua persilangan agar diperoleh variabilitas genetik yang luas dan efek heterosis yang tinggi.

Analisis kekerabatan dari aksesi/spesies nenas yang diuji disajikan pada Gambar 3. Analisis kluster UPGMA mengelompokkan 19 aksesi menjadi enam kelompok pada koefisien kemiripan genetik 0,75. Kelompok pertama (I) terdiri atas empat aksesi (N-05, N-35, Y, dan G3) yang secara morfologi termasuk klon Queen. Kelompok dua (II) terdiri atas dua sub kelompok, yaitu subkelompok IIa terdiri atas satu aksesi (G13 kultur jaringan) dan subkelompok IIb terdiri atas lima aksesi (N-68, N-72, N-73, BB, D) yang termasuk dalam klon Cayenne. Kelompok III terdiri atas lima aksesi, yaitu N-18, N-25, N-19, N-32, dan N-30. Aksesi N-18, N-25, dan N-19 secara morfologi termasuk dalam kelompok Spanish. Kelompok IV terdiri atas dua aksesi, yaitu aksesi N-85 dan N-62 yang secara morfologi termasuk dalam spesies *A. bracteatus*. Kelompok V dan VI masing-masing terdiri atas satu aksesi, yaitu N-61 (*A. lucidus*) dan N-94 (*A. nanus*). Hasil RAPD ini menunjukkan bahwa aksesi-aksesi yang tergabung dalam satu kelompok mempunyai kemiripan secara morfologi.

Secara morfologi, spesies *A. comosus* terdiri atas klon Cayenne, Queen, Spanish Abacaxi/Pernambuco dan Perola (Py, Lacoëuilhe & Teisson 1987). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kelompok I, II, dan III tergabung ke dalam satu kelompok, yaitu spesies *A. comosus* pada kesamaan genetik 70%. Hasil yang sama juga ditunjukkan oleh Popluechai, Onto & Eungwanichayapant (2007) bahwa kelompok Cayenne, Queen, dan Spanish tergabung ke dalam kelompok *A. comosus* pada kesamaan genetik 0,71. Berdasarkan kesamaan genetik tersebut maka *A. comosus* termasuk mempunyai keragaman genetik yang rendah, walaupun secara morfologi spesies tersebut mempunyai morfologi yang sangat beragam. Untuk meningkatkan keragaman genetik nenas tersebut dapat dilakukan melalui mutasi, baik menggunakan kimia maupun radiasi, variasi somaklonal melalui kultur jaringan, dan hibridisasi interspesifik antarspesies nenas (Ines *et al.* 2009).

Hasil analisis RAPD tersebut menunjukkan bahwa aksesi N-25, N-32, dan N-30 tergabung kedalam kelompok Spanish pada kemiripan genetik 76%, walaupun N-30 terpisah menjadi subkelompok III. Secara morfologi, perbedaan utama aksesi N-32 dan N-30 dengan kelompok Spanish adalah N-32 daun tidak berduri, warna daun agak kemerahan, dan kulit buah berwarna merah, sedangkan N-30 memiliki daun dan buah muda yang ada warna putihnya.

Secara umum pada Gambar 3 terlihat bahwa 19 aksesi terkelompok ke dalam empat spesies, yaitu *A. comosus*, *A. bracteatus*, *A. lucidus*, dan *A. nanus*. Spesies *A. comosus* lebih dekat kekerabatannya dengan *A. bracteatus* daripada dengan *A. lucidus* dan *A. nanus*. Persilangan antara *A. comosus* dengan salah satu dari ketiga spesies tersebut akan diperoleh variabilitas genetik yang luas dan efek heterosis yang tinggi. Untuk perakitan varietas nenas dengan sifat ketahanan terhadap penyakit, *A. comosus* dapat disilangkan dengan *A. bracteatus* dan *A. lucidus*. Spesies *A. bracteatus* mempunyai karakter ketahanan terhadap nematoda, penyakit busuk akar dan fusariosis, sedangkan *A. lucidus* mempunyai karakter ketahanan terhadap penyakit busuk akar dan mahkota (Py, Lacoëuilhe & Teisson 1987).

KESIMPULAN DAN SARAN

Tingkat polimorfisme 20 primer yang diuji berkisar antara 33–100% dengan rata-rata sebesar 87%. Primer dengan tingkat polimorfisme 100%, yaitu RAPD3, OPA13, OPAV3, OPC12, OPC16, dan OPY15.

Analisis RAPD mampu membedakan aksesi, kelompok, dan spesies nenas melalui beberapa marka spesifik. Kelompok Cayenne dicirikan oleh marka RAPD1 pada pita ukuran 1.000 bp dan OPAV3 pada pita ukuran 700 bp, kelompok Queen oleh marka RAPD3 pada pita ukuran 700 bp, serta kelompok Spanish oleh marka RAPD2 dan RAPD3 pada pita ukuran 1.500 bp.

Analisis kluster mengelompokkan 19 aksesi menjadi enam kelompok pada koefisien kemiripan genetik 0,75, yaitu kelompok Queen, Cayenne, Spanish, *A. bracteatus*, *A. lucidus*, dan *A. nanus*. Aksesi yang diuji mempunyai keragaman genetik yang luas dengan nilai kesamaan genetik berkisar 0,41 – 0,85. Aksesi dengan kesamaan genetik terbesar, yaitu antara N-73 dengan BB (0,85) dan terkecil, yaitu antara N-94 (*A. nanus*) dengan N-18 (Green Spanish) sebesar 0,41. Aksesi yang mempunyai kesamaan genetik tinggi salah satunya dapat dieliminasi untuk efisiensi dalam pengelolaan plasma nutfah, sedangkan aksesi-aksesi yang memiliki kesamaan genetik kecil, baik digunakan sebagai tetua persilangan agar diperoleh variabilitas genetik yang luas dan efek heterosis yang tinggi.

Perlu penelitian lanjutan untuk mengetahui urutan basa dari pita RAPD spesifik yang diperoleh dan keterkaitannya dengan karakter tertentu pada nenas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Dwi Wahyuni Ardiana, SP yang telah membantu pelaksanaan kegiatan di laboratorium biologi molekuler.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bairu, MW, Fennell, CW & van Staden, J 2006, 'The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa AAA cv, Zelig*)', *Scientia Horticulturae*, vol. 108, no. 4, pp. 347–351.
2. Borojević, S & others 1990, *Principles and methods of plant breeding*, Elsevier, Amsterdam.
3. Brewbaker, JL & Gorrez, DD 1967, 'Genetics of self-incompatibility in the Monocot genera, *Ananas* (pineapple) and *Gasteria*', *American Journal of Botany*, pp. 611–616.
4. Carlier, J, Reis, A, Duval, M & Leitão, J 2004, 'Genetic maps of RAPD, AFLP, and ISSR markers in *Ananas bracteatus* and *A. comosus* using the pseudo-testcross strategy', *Plant Breeding*, vol. 123, no. 2, pp. 186–192.
5. Carvalho, VP, Ruas, CF, Ferreira, JM, Moreira, RMP & Ruas, PM 2004, 'Genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) landraces assessed by RAPD markers', *Genetics and Molecular Biology*, vol. 27, no. 2, pp. 228–236.
6. Collins, J 1968, *The pineapple, botany, cultivation, and utilization*, Leonard Hill, London.
7. Doyle, J & Doyle, J 1987, 'Isolation of plant DNA from fresh tissues', *Focus*, no. 12, pp. 13–15.
8. Eeuwens, CJ, Lord, S, Donough, CR, Rao, V, Vallejo, G & Nelson, S 2002, 'Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of "mantled" flowering in clonally propagated oil palm', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 70, no. 3, pp. 311–323.
9. Feuser, S, Meler, K, Daquinta, M, Guerra, MP & Nodari, RO 2003, 'Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 72, no. 3, pp. 221–227.
10. Hadiati, S, Kuswandi, Ihsan, F & Ardiana, D 2015, 'Karakterisasi morfologi dan pengelompokan beberapa akses jambu air berdasarkan RAPD', in *Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Hortikultura Indonesia*, Pusat Kajian Hortikultura Tropika, Bogor, pp. 349 – 356.
11. Hadiati, S, Yulianti, S & Sukartini 2009, 'Pengelompokan dan jarak genetik plasma nutfah nenas berdasarkan karakter morfologi', *J. Hort.*, vol. 19, no. 3, pp. 264–274.
12. Ines, M, Magdalita, P, Vina, C, Cruz, F & Villegas, V 2009, 'Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis reveal genetic relationships among pineapple (*A. comosus* (L.) Merr) genotypes', *Philippine Journal of Crop Science*, vol. 34, no. 3, pp. 1–10.
13. Kato, CY, Nagai, C, Moore, PH, Zee, F, Kim, MS, Steiger, DL & Ming, R 2005, 'Intra-specific DNA polymorphism in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) assessed by AFLP markers', *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol. 51, no. 8, pp. 815–825.
14. Mansyah, E 2012, 'Struktur genetik manggis (*Garcinia mangostana* L.) berbasis marka morfologi dan molekuler', Disertasi, Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
15. Masoud, S & Hamta, A 2008, 'Cytogenetic analysis of somaclonal variation in regenerated plants of berseem clover (*Trifolium alexandrinum* L.)', *Caryologia*, vol. 61, no. 4, pp. 392–396.
16. Nandariyah, Soemartono & Taryono 2004, 'Keragaman kultivar salak (*Salacca zalacca*)', *Agrosains*, vol. 6, no. 2, pp. 75 – 79.
17. Pusat Data dan Informasi Pertanian 2016, *Jakarta (ID): Kementerian Pertanian, Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian*.
18. Popluechai, S, Onto, S & Eungwanichayapant, PD 2007, 'Relationships between some Thai cultivars of pineapple (*Ananas comosus*) revealed by RAPD analysis', *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, vol. 29, no. 6.
19. Py, C, Lacoëuilhe, J & Teisson, C 1987, *The pineapple, cultivation and uses*, GP Maisonneuve & Larose, Paris.
20. Rohlf, J 2000, *Numerical taxonomy and multivariate analysis system*, version 2.1, Exceter softwer, New York.
21. Roostika, I, Khumaida, N & Ardie, SW 2015, 'RAPD analysis to detect somaclonal variation of pineapple in vitro cultures during micropropagation', *BIOTROPIA-The Southeast Asian Journal of Tropical Biology*, vol. 22, no. 2, pp. 109–119.
22. Ruas, CF, Ruas, PM & Cabral, JRS 2001, 'Assessment of genetic relatedness of the genera *Ananas* and *Pseudananas* confirmed by RAPD markers', *Euphytica*, vol. 119, no. 3, pp. 245–252.
23. Ruas, PM, Ruas, CF, Fairbanks, DJ, Andersen, WR & Cabral, JS 1995, 'Genetic relationship among four varieties of pineapple, *Ananas comosus*, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis', *Revista Brasileira de Genética*, vol. 18, p. 413.
24. Rugayah 2006, 'Eksplorasi, koleksi, karakterisasi, evaluasi, konservasi, dan pemanfaatan sumber daya genetik', in *Prosiding workshop penguatan sistem pengelolaan sumber daya genetik hortikultura lingkup Puslitbang Hortikultura*, Puslitbang Hortikultura, Jakarta, pp. 10–18.
25. Santos, MDM, Buso, GCS & Torres, AC 2008, 'Evaluation of genetic variability in micropropagated propagules of ornamental pineapple [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley) Coppens and Leal] using RAPD markers', *Genetics and Molecular Research*, vol. 7, no. 4, pp. 1097–1105.
26. Soneji, JR, Rao, PS & Mhatre, M 2002, 'Suitability of RAPD for analyzing spined and spineless variant regenerants of pineapple (*Ananas comosus* L., Merr.)', *Plant Molecular Biology Reporter*, vol. 20, no. 3, p. 307.
27. Sripaoraya, S, Blackhall, NW, Marchant, R, Power, JB, Lowe, KC & Davey, MR 2001, 'Relationships in pineapple by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis', *Plant Breeding*, vol. 120, no. 3, pp. 265–267.
28. Sriyadi, B, Setiamihardja, R, Baihaki, A & Astika, W 2002, 'Hubungan kekerabatan genetik antar tanaman the F1 dari persilangan TRI 2024 X PS 1 berdasarkan penanda RAPD', *Zuriat*, vol. 13, no. 1.

29. Tatineni, V, Cantrell, RG & Davis, DD 1996, 'Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs', *Crop Science*, vol. 36, no. 1, pp. 186–192.
30. Williams, JGK, Kubelik, AR, Livak, KJ, Rafalski, JA & Tingey, S V 1990, 'DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers', *Nucleic acids research*, vol. 18, no. 22, pp. 6531–6535.

Lampiran 1. Daftar akses nenas yang digunakan sebagai materi penelitian (*List of pineapple accessions were used as research materials*)

Akses (Accessions)	Ciri morfologi (<i>Morphological characteristics</i>)
N-05 (Queen)	Daun berduri merah, pendek dan sempit, buah silindris, warna kulit dan buah masak kuning terang, <i>core</i> kecil, bentuk mata menonjol
N-35 (Queen)	Daun berduri merah, bentuk buah silindris, warna kulit dan daging buah kuning terang, <i>core</i> kecil, bentuk mata menonjol, TSS: 19–20°brix
Y (Queen hasil kuljar dari N-35)	Daun berduri merah, bentuk buah silindris, warna kulit buah kuning terang, bentuk mata menonjol, daging tembus cahaya, berair, kurang manis (TSS: 14–17°brik), jumlah tunas tangkai dan dasar buah lebih banyak dan tunas anakan lebih sedikit dibanding N-35
G3 (Queen hasil dari kuljar)	Serupa dengan N-05 dan N35, tetapi bentuk mata lebar dan beberapa mata bentuk tidak sempurna, daging buah kurang berair, TSS lebih rendah (10 – 17°briks), terdapat banyak calon tunas dasar buah
G13 (Queen hasil dari kuljar)	Serupa dengan G3
N-68 (Cayenne berduri)	Serupa dengan N-72 dan N-73, tetapi N-68 seluruh tepi daun berduri merah
N-72 (Cayenne)	Daun: tidak berduri (kecuali dekat ujung), pendek dan lebar, bagian tepi daun berwarna hijau dan bagian tengah berwarna merah keunguan. Buah: bentuk mata datar dan lebar, ukuran buah 1–2,5 kg, bentuk buah silindris, warna kulit masak kuning–oranye, daging buah lebih tembus cahaya, berair, warna kuning muda, ukuran <i>core</i> medium
N-73 (Cayenne)	Serupa dengan N-72
BB (Cayenne hasil kuljar dari N-73 tanaman no. 2)	Serupa dengan N-73, tetapi BB buahnya sering pecah menjelang panen
D (Cayenne hasil kuljar dari N-73 tanaman no.1)	Serupa dengan N-73, tetapi D buahnya sering pecah menjelang panen
N-18 (Green Spanish)	Daun berduri hijau, panjang dan sempit, berwarna hijau. Buah: bentuk mata datar dan lebar, bentuk buah silindris, tangkai buah pendek, warna kulit buah pada saat muda hijau
N-25 (Nenas Hijau)	Serupa dengan N18, tetapi bentuk buah kerucut panjang dan di dasar buah terdapat seperti calon buah yang berjumlah 3–4
N-19 (Red Spanish)	Daun: berduri kemerahan, panjang dan sempit, tepi daun berwarna merah kecokelatan dan bagian tengah daun berwarna kehijauan. Buah: bentuk mata datar dan lebar, bentuk buah silindris, tangkai buah pendek, warna kulit buah pada saat muda hijau kemerahan
N-32 (Nenas Merah cerah)	Daun: tidak berduri, panjang dan sempit, tepi daun berwarna merah terang kecokelatan dan bagian tengah daun berwarna kehijauan. Buah bentuk mata datar dan lebar, bentuk buah silindris, tangkai buah pendek, warna kulit buah pada saat muda merah terang
N-85 (<i>A. brachateatus</i>)	Daun: berduri panjang dan jarang dengan warna merah, tepi daun berwarna merah kecokelatan dan bagian tengah daun berwarna kehijauan. Ciri yang mencolok adalah mempunyai <i>bract</i> /seludang yang panjang, berwarna pink pada setiap <i>fruitlet</i> , mempunyai tunas slip yang banyak pada dasar buah dan mahkota; serta tangkai buah panjang. Buah berbiji banyak dan tidak dapat dimakan.
N-62 (<i>A. brachateatus</i> variegata)	Serupa dengan N-85, tetapi tepi daun berwarna putih kemerahan dan bagian tengah daun berwarna hijau,berduri
N-30 (nenas putih)	Daun berduri rapat berwarna putih, tepi daun putih dan bagian tengah hijau, jumlah mahkota ≥ 1 , kulit buah muda hijau keputihan
N-61 (<i>A. lucidus</i>)	Daun tidak berduri, berwarna merah hati, lurus dan tegak dengan lebar 3,5 cm, tanaman berukuran sedang; buah berukuran kecil (panjang 12 cm), tangkai buah kecil dan panjang
N-94 (<i>A. nanus</i>)	Daun panjang dan kecil, duri pendek, kuat/kaku, mengarah ke atas. Diameter buah sangat kecil ± 4 cm.

Lampiran 2. Matriks kesamaan genetik 19 aksesi nenas menggunakan 20 primer (*Genetic similarity of 19 pineapple accessions using 20 primers*)

Aksesi *	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	1,00																		
2	0,74	1,00																	
3	0,77	0,81	1,00																
4	0,67	0,73	0,75	1,00															
5	0,68	0,63	0,72	0,63	1,00														
6	0,67	0,65	0,70	0,69	0,64	1,00													
7	0,67	0,67	0,71	0,72	0,71	0,76	1,00												
8	0,68	0,63	0,75	0,70	0,75	0,74	0,81	1,00											
9	0,68	0,67	0,74	0,74	0,70	0,77	0,80	0,85	1,00										
10	0,59	0,57	0,70	0,64	0,68	0,70	0,69	0,80	0,75	1,00									
11	0,63	0,55	0,68	0,65	0,65	0,64	0,67	0,69	0,68	0,69	1,00								
12	0,65	0,60	0,68	0,64	0,65	0,62	0,70	0,69	0,66	0,68	0,79	1,00							
13	0,65	0,56	0,59	0,61	0,56	0,66	0,67	0,65	0,64	0,61	0,72	0,77	1,00						
14	0,55	0,57	0,58	0,64	0,54	0,53	0,61	0,64	0,60	0,65	0,73	0,76	0,72	1,00					
15	0,56	0,55	0,58	0,58	0,61	0,53	0,56	0,62	0,56	0,59	0,60	0,65	0,62	0,64	1,00				
16	0,54	0,50	0,56	0,57	0,58	0,53	0,53	0,60	0,56	0,64	0,60	0,66	0,56	0,67	0,83	1,00			
17	0,60	0,59	0,60	0,58	0,56	0,54	0,60	0,63	0,57	0,58	0,69	0,78	0,77	0,80	0,71	0,63	1,00		
18	0,48	0,54	0,52	0,53	0,55	0,59	0,57	0,64	0,56	0,60	0,51	0,56	0,53	0,59	0,63	0,63	0,61	1,00	
19	0,47	0,51	0,47	0,50	0,48	0,48	0,49	0,49	0,49	0,54	0,41	0,42	0,47	0,45	0,45	0,47	0,48	0,59	1,00

*Aksesi : 1), N-05, 2), N-35, 3), Y, 4), G3, 5), G13, 6), N-68, 7), N-72, 8), N-73, 9), BB, 10), D, 11), N-18, 12), N-25, 13), N-19, 14), N-32, 15), N-85, 16), N-62, 17), N-30, 18), N-61, 19), N-94